

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07546

研究課題名(和文) TNF受容体型補助刺激分子による自然リンパ球の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of innate lymphoid cells by TNFRSF co-stimulatory molecules

研究代表者

奥山 祐子 (Okuyama, Yuko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50624475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでTNF受容体型のT細胞補助刺激分子の一つであるGITRが肺組織2型自然リンパ球(ILC2)の増殖と活性化を促進し、アレルギー性肺炎疾患の発症に寄与することを明らかにした。本研究の結果、炎症時ILC2自身にGITRリガンド(GITRL)の発現が誘導されることを見出した。GITR-L欠損マウスではILC2依存的な肺炎疾患病態が減弱した。また、ヒト末梢血由来ILC2において各補助刺激シグナルの発現変化と機能が確認された。以上より、ILC2細胞上の補助刺激シグナルはILC2同士の相互作用による制御、およびT細胞の機能制御にも関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで補助刺激分子はT細胞に発現し、抗原依存的なT細胞の活性化を制御することが知られているが、抗原受容体を持たない自然リンパ球に発現する補助刺激分子はT細胞とは異なる新規の機能を有する。この機能の詳細を解析した点で本研究は学術的な意義が高い。またILC2はアレルギー疾患の発症に関与することから、GITR-GITRLシグナルを介したILC2の機能制御を明らかにすることで、これらを標的としたアレルギー疾患の新規治療法開発に繋がることから、社会的意義が大きい研究成果である。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that GITR, a TNF receptor-type T cell co-stimulator, promotes proliferation and activation of lung tissue type 2 innate lymphocytes (ILC2) and contributes to the pathogenesis of allergic lung inflammatory disease. In this study, we found that GITR ligand (GITRL) expression is induced by ILC2 itself during inflammation, and ILC2-dependent lung inflammatory disease pathology was attenuated in GITR-L-deficient mice. In addition, the expression changes and functions of each co-stimulatory signal were confirmed in human peripheral blood-derived ILC2. These findings suggest that co-stimulatory signals on ILC2 cells may be involved in the regulation of ILC2 interactions as well as in the regulation of T cell function.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 ILC2 補助刺激 GITR アレルギー

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (ILC) は、自然免疫系を担う新たなリンパ球系細胞として発見され、炎症反応を制御し生体恒常性維持と生体防御に重要な細胞として注目されている。なかでも 2 型自然リンパ球 (ILC2) は、Th2 サイトカインの産生を介してアレルギー性呼吸器炎症、寄生虫感染防御、アトピー性皮膚炎等の病態形成に関与する。

当研究室では以前より、TNF 受容体型の T 細胞共刺激分子 (OX40, GITR, CD27 など) を中心に、さまざまな炎症疾患における免疫細胞機能制御について研究を行っている。これまでに我々は TNF 受容体型の T 細胞補助刺激分子の一つである GITR (Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor) が ILC2 に強く発現することを見いだした。そして、マウスにおいて GITR シグナルが肺組織 ILC2 の増殖と活性化を促進し、アレルギー性肺炎症疾患の発症に寄与することを明らかにした。さらに、GITR リガンド (GITRL) 発現細胞の探索を進めたところ、炎症時肺組織において、ILC2 自身にリガンドの発現が誘導されることを見出した。ILC2 細胞上の GITR-L は ILC2 同士の間相互作用による制御、および T 細胞に発現する GITR を介した T 細胞の機能制御にも関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、GITR 補助刺激シグナルによる ILC 同士および ILC-T 細胞間相互作用を介したアレルギー性炎症疾患の制御機構を明らかにすることを目的とする。マウスアレルギー性肺炎症モデルを用い ILC を解明する。さらに、ヒト ILC を用いた解析により、GITR-L の治療・診断の標的としての有用性を検証する。GITR-L/GITR 補助刺激による ILC の機能制御を標的としたアレルギー性炎症疾患の新規治療標法・診断法開発への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) GITR-L 発現制御機構

① 定常状態あるいはアレルギー発症時のマウス肺細胞の GITR リガンド mRNA およびタンパク質の量を qPCR 法、フローサイトメトリー法にて測定する。

② GITR-L 発現を誘導する特異的なサイトカインシグナル伝達について解析する。

(2) ILC-ILC、ILC-T 細胞間相互作用への GITR-L の作用機序

① 肺組織 ILC2 を *in vitro* にて IL-33 で刺激し GITR-L 発現を誘導し、抗 GITR 抗体添加により GITR シグナルを阻害し、ILC2 の細胞増殖、IL-5、IL-13 サイトカイン産生を解析する。

② 肺組織 ILC2 を IL-33 で刺激し GITR-L 発現を誘導し、naïve CD4⁺ T 細胞と共培養し、T 細胞の細胞増殖能、各ヘルパーサブセットの分化率、機能を検証する。

(3) ヒト ILC2 における GITR-L/GITR シグナルの作用の解明

① ヒト末梢血より PBMC を精製し、ILC1,2,3 特異的な表面マーカーによる染色を行い、フローサイトメトリー法にて定常状態での GITR-L の発現を検出する。

② ヒト ILC をセルソーターで単離し、mRNA における GITR-L の発現を確認する。

③ 単離した ILC を *in vitro* にて IL-33、TSLP、IL-25、IL-2、L-9 等のサイトカインのあらゆる組み合わせで刺激し、GITR-L と GITR の発現変化を解析する。

4. 研究成果

(1) マウスへのパパイン鼻腔内投与による肺炎症誘導後に肺組織 ILC2 において GITR-L の発現の亢進が認められた。GITR-L 欠損マウスではパパイン鼻腔内投与により誘導される ILC2 依存的な肺炎症病態が減弱した。マウス由来 ILC2 において *in vitro* での IL-33 刺激により GITR-L の発現誘導が確認された。

(2) IL-33 刺激により活性化させた ILC2 においてみとめられる細胞増殖、サイトカイン産生は GITR シグナルの阻害により減弱する傾向が得られた。ILC2 と T 細胞との共培養において、IL-33 による活性化前後の ILC2 で比較を行った結果、活性化 ILC2 存在下で T 細胞増殖率の亢進が認められた。Treg の分化についての顕著な差異は得られなかった。T 細胞機能制御への関与につ

いては更なる検証が必要である。

(3) ヒト末梢血より PBMC を精製し、ILC1,2,3 を特異的マーカーで染色し、各分画での補助刺激分子の発現を解析した。その結果、健常成人の ILC2 においては GITR-L の発現量は低いことがわかった。成人アトピー性皮膚炎患者群で発現上昇傾向が認められたが有意差は得られなかった。ヒト末梢血由来 ILC2 をセルソーターで単離培養し *in vitro* においてサイトカイン刺激を行なったところ、活性化による各補助刺激分子発現の変化が認められた。なかでも IL-2+IL-33 共刺激により GITR-L 発現上昇が認められた。

以上より、ILC2 細胞上の補助刺激シグナルは ILC2 同士の相互作用による制御、および T 細胞の機能制御にも関与すると考えられる。これまで補助刺激分子は T 細胞に発現し、抗原依存的な T 細胞の活性化を制御することが知られているが、抗原受容体を持たない自然リンパ球に発現する補助刺激分子は T 細胞とは異なる新規の機能を有する。この機能の詳細を解析する研究は学術的な意義が高く、今後さらなる研究を進めていく必要がある。また ILC2 はアレルギー疾患の発症に関与することから、GITR-GITRL シグナルを介した ILC2 の機能制御を明らかにすることで、これらを標的としたアレルギー疾患の新規治療法開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tashiro R, Niizuma K, Kasamatsu J, Okuyama Y, Rashad S, Kikuchi A, Fujimura M, Kure S, Ishii N, Tominaga T.	4. 巻 236(11)
2. 論文標題 Dysregulation of Rnf 213 gene contributes to T cell response via antigen uptake, processing, and presentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 7554-7564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawahara E, Azuma M, Nagashima H, Omori K, Akiyama S, Fujimori Y, Oishi M, Shibui N, Kawaguchi K, Morita M, Okuyama Y, Ishii N, So T.	4. 巻 208(3)
2. 論文標題 TNF Receptor-Associated Factor 5 Limits IL-27 Receptor Signaling in CD4 + T Lymphocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 642-650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2001358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Niihori T, Tanoshima R, Sasahara Y, Sato A, Irie M, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Shirota M, Abe T, Okuyama Y, Ishii N, Nakayama K, Kure S, Imaizumi M, Aoki Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity in individuals with MECOM variants in 2 families	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai T, Okuyama Y, Kobayashi S, Phung HT, Asao A, Kawabe T, Ndhlovu LC, Riccardi C, Kudo H, Wada M, Nio M, So T, Ishii N.	4. 巻 34(11)
2. 論文標題 GITR controls intestinal inflammation by suppressing IL-15-dependent NK cell activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 14820-14831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001675R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okuyama Y, Okajima A, Sakamoto N, Hashimoto A, Tanabe R, Kawajiri A, Kawabe T, Ishii N	4. 巻 637
2. 論文標題 IL-33-ILC2 axis promotes anti-tumor CD8+ T cell responses via OX40 signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato A, Azuma M, Nagai H, Imai W, Kawaguchi K, Morita M, Okuyama Y, Ishii N, So T.	4. 巻 45(12)
2. 論文標題 OX40 Ligand-Mannose-Binding Lectin Fusion Protein Induces Potent OX40 Cosignaling in CD4+ T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1798-1804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00493.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yuko Okuyama, Tomomi Musha, Mizuna Fujita, Takeshi Kawabe, Atsuko Asao, Rina Morishita, Toshiya Takahashi, Maki Ozawa, Kenshi Yamasaki, Yohei Watanabe, Satoshi Horino, Yuji Saita, Yuji Nagano, Masaki Abe, Setsuya Aiba, Katsushi Miura, Naoto Ishii.
2. 発表標題 Characterization and composition of innate lymphoid cells in pediatric and adult allergic patients
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuki Azuma, Masashi Morita, Yuko Okuyama, Naoto Ishii, Takanori So
2. 発表標題 TNF receptor-associated factor 5 reciprocally controls signals through IL-27 receptor and GITR in CD4+ T-lymphocytes
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Kawajiri, Minami Ishii, Li Jing, Yang Ziyang, Kosuke Sato, Shunichi Tayama, Yuko Okuyama, Hideo Harigae, Naoto Ishii, Takeshi Kawabe
2. 発表標題 Inflammatory potential of self-driven memory-phenotype CD4+ T cells
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunichi Tayama, Takeshi Kawabe, Yuya Kitamura, Kyoga Hiraide, Jing Li, Ziyang Yang, Akihisa Kawajiri, Kosuke Sato, Yuko Okuyama, Masanobu Morita, Takaaki Akaike, Naoto Ishii
2. 発表標題 Reactive sulfide species generated by cysteinyl-tRNA synthetase plays a regulatory role in T cell-induced colitis in a T cell-intrinsic manner
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Okuyama, Akira Okajima, Nao Sakamoto, Ryuto Tanabe, Ayaka Hashimoto, Atsuko Asao, Ziyang Yang, Akihisa Kawajiri, Takeshi Kawabe, Naoto Ishii.
2. 発表標題 ILC2-derived OX40L-OX40 signal promotes cytotoxic CD8+ T cell-mediated antitumor immunity in murine melanoma
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	河部 剛史	東北大学・医学系研究科・准教授	
	(Kawabe Takeshi)		
	(50834652)	(11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------